



AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DISCRIMINAÇÃO QUIRAL DA FASE ESTACIONÁRIA TRIS(3,5-DIMETILFENILCARBAMATO) DE AMILOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE UTILIZAÇÃO DA COLUNA CROMATOGRÁFICA

A. F. N. DOMINGUES¹ e C. C. SANTANA²

¹ Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Agroindústria

² Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: ferraiolo@cpatu.embrapa.br

RESUMO – A síntese de substâncias opticamente puras e a separação de enantiômeros com elevado grau de pureza enantiomérica é uma importante tarefa das indústrias químicas e farmacêuticas modernas, as quais têm intensificado o desenvolvimento de novas tecnologias devido à disponibilidade de eficientes técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência em fases estacionárias quirais. Os fatores levados em consideração no desenvolvimento ou utilização destas fases são: elevada disponibilidade, custos relativamente baixos, variada aplicação, estabilidade mecânica e química, elevada capacidade de adsorção e enantioseletividade. Neste trabalho, avaliou-se a capacidade de discriminação quiral da fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, sintetizada a partir de uma metodologia definida em escala analítica e em quantidade suficiente para a confecção de nove colunas cromatográficas semipreparativas. Os perfis de eluição e os parâmetros cromatográficos, resolução e fator de separação, foram avaliados após consecutivas injeções da mistura racêmica do omeprazol. Observou-se um aumento no tempo de retenção dos enantiômeros provavelmente devido a interações não específicas entre estes e o polissacarídeo não reagido e/ou a superfície da sílica não recoberta. A diminuição da capacidade de discriminação quiral da fase estacionária pode ser atribuída à perda de seletor quiral, o qual está apenas adsorvido fisicamente sobre as partículas de sílica.

1. INTRODUÇÃO

Os enantiômeros são estereoisômeros cujas moléculas são imagens especulares umas das outras, que não se superpõem. A enantiomeria só ocorre em compostos cujas moléculas são quirais.

Compostos enantiomericamente puros podem ser obtidos por síntese estereoseletiva (produção de um único enantiômero) ou a partir de uma mistura racêmica (produção de ambos enantiômeros) (Francotte, 1994).



Na síntese estereoseletiva, para que haja a formação preponderante de um dos enantiômeros é necessário que substratos quirais e pró-quirais influenciem o desenvolvimento da reação. Neste caso, auxiliares, reagentes e catalisadores quirais são utilizados. (Baird e Taylor, 1995; Francotte, 1994; Pinheiro e Ferreira, 1998; Versteeg *et al.*, 1995).

No método racêmico, o racemato é obtido por uma seqüência de reações com menor grau de dificuldade comparado às correspondentes formas opticamente ativas. Em seguida, a separação dos enantiômeros é obtida por recristalização, cromatografia ou membrana (Francotte, 1994, 2001). A enantioseparação por cromatografia pode ser realizada utilizando-se uma fase estacionária aquiral e um solvente ou aditivo quiral adicionado à fase móvel ou uma fase estacionária quiral (FEQ) (Francotte e Buchheit, 1992).

As principais vantagens do emprego da cromatografia, quiral ou aquiral, são: aplicação a uma variedade de misturas racêmicas; obtenção de ambos enantiômeros; técnica rápida e relativamente fácil; alto grau de pureza óptica dos enantiômeros isolados e separação dos enantiômeros de misturas racêmicas, cujos compostos racemizam facilmente ou apresentam quiralidade tipo hélice ou helicoidal (Francotte, 1994).

Nas últimas duas décadas, inúmeros seletores quirais têm sido avaliados em relação à sua capacidade de resolução quiral e emprego em centenas de fases estacionárias quirais. Dentre essas fases, aquelas que se mostraram mais promissoras, quanto à enantioseparação de uma ampla classe de compostos quirais, estão disponíveis comercialmente para separações em escala preparativa e são empregadas em aplicações diversas. Para a análise de fármacos quirais e seus metabólitos, a literatura destaca o sucesso das fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos (Bonato *et al.*, 2005; Cass *et al.*, 1997).

Celulose e amilose são polímeros com atividade óptica encontrados em maior abundância na natureza. *In natura*, apresentam propriedades mecânicas fracas e limitada capacidade de resolução quiral (Yashima, 2001). Entretanto, a derivação desses polissacarídeos em acetatos, benzoatos, triésteres e fenilcarbamatos conduz à formação de novos sítios de reconhecimento quiral para a separação dos enantiômeros de uma variedade de compostos racêmicos, melhorando assim, as propriedades cromatográficas e enantiosseletivas (Jardim *et al.*, 2006; Okamoto e Kaida, 1994; Pirkle e Pochapsky, 1989; Yashima e Okamoto, 1995). A Figura 1 mostra a formação do derivado tris(3,5-dimetilfenilcarbamato), proveniente da reação da amilose com o 3,5-dimetilfenil isocianato, utilizado neste trabalho.

A reação de derivação do polissacarídeo deve ser realizada em condições anidras para se evitar a ocorrência de reações secundárias, uma vez que o isocianato em presença de água (Figura 2) produz ácido carbâmico que pela eliminação de gás carbônico conduz a formação de uma amina primária, a qual reage com o isocianato formando um derivado de uréia (Figura 3) (Degani, 2001).

A temperatura da reação também deve ser rigorosamente controlada, dado que em temperaturas inferiores a 100 °C a reação entre o polissacarídeo e o isocianato não é completa e, temperaturas mais elevadas que esta podem levar a caramelização do carboidrato (Coimbra, 2007).

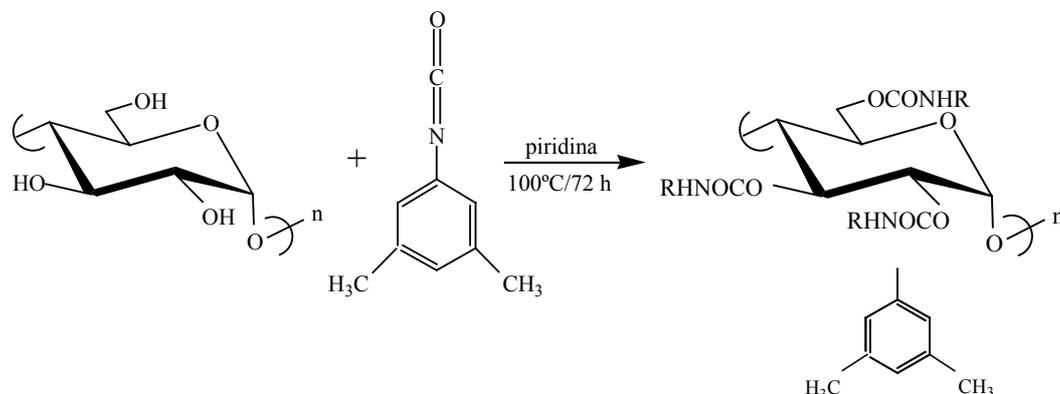


Figura 1 - Esquema reacional de derivação da amilose e formação do derivado tris(3,5-dimetilfenilcarbamato).

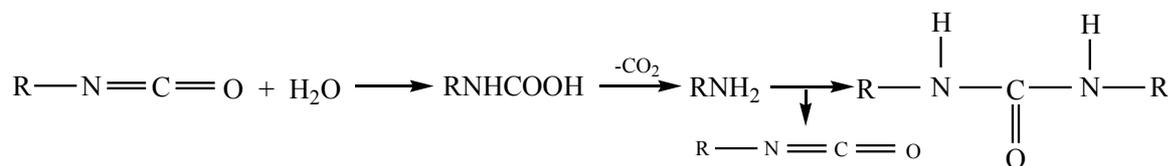


Figura 2 - Representação esquemática da reação do isocianato com a água, levando à formação do derivado de uréia.

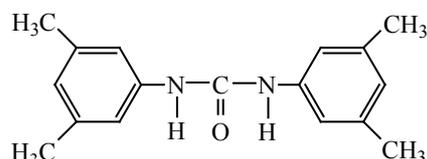


Figura 3 - Estrutura molecular do derivado de uréia (1,3-di(3'5'-dimetil)fenil uréia).

Os fatores levados em consideração no desenvolvimento ou utilização das FEQs são: elevada disponibilidade, custos relativamente baixos, variada aplicação, estabilidade mecânica e química, elevada capacidade de adsorção e enantioselectividade.

Em cromatografia, a retenção do soluto é expressa pelo fator de retenção, k , determinado pela razão entre a quantidade de moléculas retidas na fase estacionária, n_E , e as que percorrem a coluna na fase móvel, n_M . O fator de retenção também está relacionado à razão dos tempos que as moléculas ficam na fase estacionária, t_R , e na fase móvel, t_M (Collins, 2006).

$$k = \frac{n_E}{n_M} = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (1)$$

O fator de separação, α , o qual descreve a interação de equilíbrio entre os enantiômeros do soluto e a fase estacionária, a uma temperatura constante, é dado por (Cabusas, 1998):



$$\alpha = \frac{k_R}{k_S} \quad (2)$$

onde k_R e k_S são os fatores de retenção dos enantiômeros mais e menos retido, respectivamente.

No entanto, o fator de separação não engloba informações sobre a largura dos picos. Neste caso, a resolução, parâmetro analítico calculado da razão entre a distância que separa os pontos máximos dos picos e a média das larguras de suas respectivas bases, deve ser levada em consideração para avaliar a separação dos enantiômeros.

Uma outra medida de separação de dois componentes consecutivos é a resolução (R_S). Este parâmetro é calculado a partir da razão entre a distância que separa os pontos máximos das bandas cromatográficas e a média das larguras de suas respectivas bases, w_b , ou das larguras na meia altura, w_h (COLLINS, 2006).

$$R_S = 2 \frac{(t_{RR} - t_{RS})}{w_{bS} + w_{bR}} = 1,177 \frac{(t_{RR} - t_{RS})}{(w_{hS} + w_{hR})} \quad (3)$$

Quando $R_S=1$, as duas bandas estão razoavelmente separadas com somente 2% de superposição das mesmas. Maiores valores de resolução indicam melhor separação; onde $R_S=1,25$ é suficiente para fins quantitativos e $R_S>1,5$ indica separação completa (Collins, 2006).

Neste trabalho, avaliou-se a capacidade de discriminação quiral da fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, sintetizada a partir de uma metodologia definida em escala analítica e em quantidade suficiente para a preparação de duas colunas cromatográficas analíticas (15 x 0,46 cm D.I. e 25 x 0,46 cm D.I.) e nove semipreparativas (25 x 1,0 cm D.I.).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A mistura racêmica da fármaco omeprazol foi doada pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda (Itapira, São Paulo).

Os materiais e solventes utilizados na preparação das colunas e nas análises cromatográficas foram: amilose de batata tipo III (Sigma-Aldrich, EUA), colunas de aço inoxidável (Phenomenex, EUA), 3,5-dimetilfenil isocianato (Acros, EUA), hexano (J.T. Baker, EUA), hidróxido de potássio (Qhemis, Brasil), isopropanol (J.T. Baker, EUA), metanol (J.T. Baker, EUA), N,N-dimetilacetamida (Aldrich, EUA), pentóxido de fósforo (Vetec, Brasil), piridina (J.T. Baker, EUA), sílica Luna NH₂ (100 Å e 9 µm) (Phenomenex, EUA), tetrahidrofurano (THF) (Synth, Brasil), 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzeno (TTBB) (Aldrich, EUA).



As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters, modelo 2487), composto por duas bombas (modelo 1525) e detector de absorvância no ultravioleta-visível (UV-vis). Os perfis de eluição foram registrados pelo software Breeze.

2.2. Procedimento Experimental

A colunas cromatográficas, contendo a FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, adsorvida fisicamente em partículas de sílica Luna NH₂, foram confeccionadas por Freitas (2009), de acordo com a metodologia descrita em Matlin *et al.*, 1994.

As principais etapas envolvidas no processo foram: derivação da amilose, adsorção do carbamato ao suporte de sílica e empacotamento.

Síntese do derivado de polissacarídeo: Partiu-se de 1,572 ($\pm 0,001$) g de carboidrato (amilose) (balança semi-analítica Marte) previamente seco em estufa a vácuo a 60 ($\pm 1,0$) °C/24 h. Adicionou-se 60 mL de piridina anidra, previamente tratada com hidróxido de potássio (KOH), destilada e armazenada em frasco âmbar contendo peneira molecular. A mistura reacional foi aquecida a 100 ($\pm 1,0$) °C/24 h sob agitação magnética. Após resfriamento a temperatura ambiente, 5,0 g do reagente 3,5-dimetilfenil isocianato foi adicionado à mistura, a qual permaneceu em refluxo a 100 ($\pm 1,0$) °C/72 h. Decorrido o tempo, a mistura foi novamente resfriada a temperatura ambiente, o produto precipitado em 300 mL de metanol sob agitação magnética por 1 h, filtrado a vácuo em funil de placa sinterizada e lavado repetidas vezes com metanol, para total eliminação da piridina. Em seguida o derivado de polissacarídeo foi seco em dessecador com pentóxido de fósforo (P₂O₅).

Os resultados da caracterização do carbamato de amilose por espectroscopia na região do infravermelho (IV) e análise elementar (CHN) são encontrados em Freitas (2009).

Recobrimento do suporte de sílica pelo carbamato: Uma suspensão de THF (30 mL) e sílica (3,334 $\pm 0,001$ g) foi mantida sob refluxo durante 30 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, adicionou-se em pequenas proporções 0,834 ($\pm 0,001$) g do carbamato de amilose previamente solubilizado em THF e N,N-dimetilacetamida (9:1 v/v). Em seguida os solventes foram evaporados em banho de gelo com o auxílio de rotaevaporadores Buchi, modelos R-114 e R-200. O resultado final foi uma cobertura de 20% g/g de carbamato em relação à sílica Luna NH₂. Em seguida, a fase estacionária foi totalmente seca em bomba a vácuo e o tamanho de suas partículas uniformizadas e homogêneas em peneira de orifício 38 μ m, adquirida da Bertel Indústria Metalúrgica Ltda.

Os dados referentes à análise das partículas de sílica e da FEQ por técnicas de espalhamento de laser e microscopia eletrônica de varredura (MEV) estão disponíveis em Freitas (2009).

Empacotamento das colunas cromatográficas semipreparativas: Uma suspensão contendo aproximadamente 17,0000 ($\pm 0,0001$) g da fase estacionária quiral e 100 mL da mistura hexano:isopropanol (50:50 v/v) foi preparada, sonicada por três minutos e adicionada



à cada coluna semipreparativa sob pressão de 7500 psi (bomba Haskel), utilizando-se como fase móvel a mesma mistura de solventes acima, porém em proporções diferentes (90:10 v/v) (CASS *et al.*, 1999). Após o empacotamento, as colunas foram condicionadas por 24 horas em hexano:isopropanol (95:05 v/v) a uma vazão de 0,5 mL/min.

A capacidade de discriminação quiral da fase estacionária tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose foi avaliada apenas na coluna semipreparativa de número cinco através após consecutivas injeções de um composto não retido pela fase estacionária (TTBB) e da mistura racêmica do fármaco omeprazol. O TTBB foi utilizado em experimentos de pulsos cromatográficos para avaliar a homogeneidade das colunas através da determinação da porosidade total.

O número (acumulativo) de injeções realizadas antes de cada perfil (P) analisado e as condições experimentais utilizadas foram:

Perfil 1 (P1):

4 injeções do composto não retido em duplicata. Concentração (C) = 3,0 mg/mL; Temperatura (T) = 25 °C; Fase Móvel (FM) = metanol (100%); Volume de injeção ($V_{\text{injeção}}$) = 20 μL ; Vazão (Q) = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; Comprimento de onda (λ) = 254 nm.

4 injeções da mistura racêmica em triplicata. C = 0,1 mg/mL; T = 25 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}}$ = 20 μL ; Q = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; λ = 302 nm.

Perfil 2 (P2):

8 injeções do composto não retido em duplicata. C = 3,0 mg/mL; T = 25 e 35 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}}$ = 20 μL ; Q = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; λ = 254 nm.

8 injeções da mistura racêmica em triplicata. C = 0,1 mg/mL; T = 25 e 35 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}}$ = 20 μL ; Q = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; λ = 302 nm.

Perfil 3 (P3):

12 injeções do composto não retido em duplicata. C = 3,0 mg/mL; T = 25, 35 e 40 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}}$ = 20 μL ; Q = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; λ = 254 nm.

12 injeções da mistura racêmica em triplicata. C = 0,1 mg/mL; T = 25, 35 e 40 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}}$ = 20 μL ; Q = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; λ = 302 nm.

Perfil 4 (P4):

16 injeções do composto não retido em duplicata, C = 3,0 mg/mL; T = 25, 35, 40 e 50 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}}$ = 20 μL ; Q = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; λ = 254 nm.

16 injeções da mistura racêmica em triplicata. C = 0,1 mg/mL; T = 25, 35, 40 e 50 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}}$ = 20 μL ; Q = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; λ = 302 nm.



Os parâmetros cromatográficos resolução (R_s) e fator de separação (α) foram calculados pelo software do equipamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores de R_s e α , obtidos após consecutivas injeções do TTBB e da mistura racêmica, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros cromatográficos

	P1	P2	P3	P4
R_s	1,02	0,97	0,72	-
α	1,25	1,23	1,16	1,12

$C = 0,1$ mg/mL; $T = 25$ °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μ L; $Q = 4,0$ mL/min; $\lambda = 302$ nm.

Pode-se observar um decréscimo na resolução e no fator de separação após um determinado tempo de uso da coluna cromatográfica. A diminuição da capacidade de discriminação quiral da fase estacionária pode ser atribuída, provavelmente, à perda de seletor quiral, o qual está apenas adsorvido fisicamente sobre as partículas de sílica.

Os perfis de eluição dos enantiômeros referentes a P1, P2, P3 e P4 são apresentados na Figura 4. Pode-se observar um aumento no tempo de retenção provavelmente devido a interações não específicas entre os enantiômeros do omeprazol e o polissacarídeo não reagido e/ou a superfície da sílica não recoberta durante o processo de recobrimento.

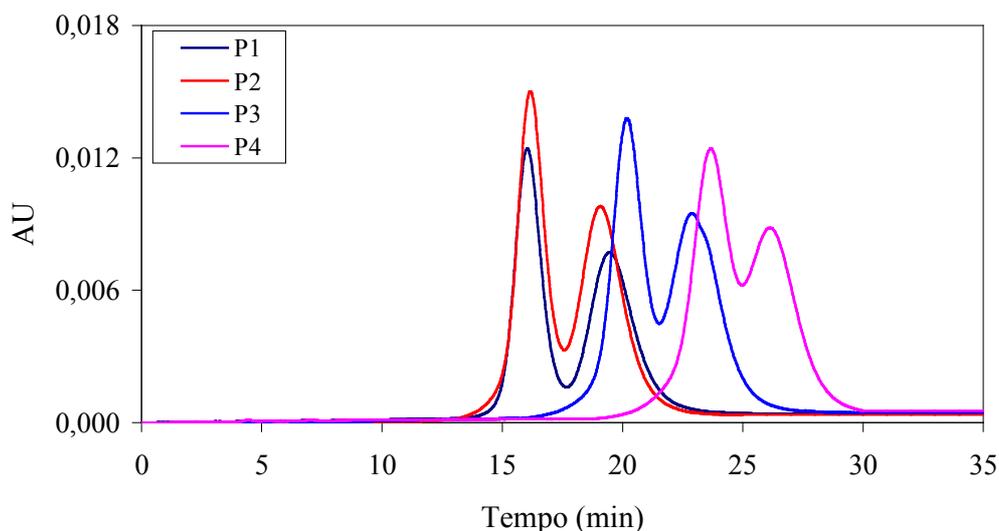


Figura 4 - Perfis de eluição dos enantiômeros do omeprazol referentes a P1, P2, P3 e P4. Coluna SP5. Condições experimentais: $C = 0,1$ mg/mL; $T = 25$ °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μ L; $Q = 4,0$ mL/min; $\lambda = 302$ nm.



4. CONCLUSÕES

Observou-se um decréscimo nos valores dos parâmetros cromatográficos, fator de separação e resolução após um determinado tempo de uso da coluna cromatográfica. A diminuição da capacidade de discriminação quiral da fase estacionária pode ser atribuída à perda de seletor quiral, o qual está apenas adsorvido fisicamente sobre as partículas de sílica. Também observou-se um aumento no tempo de retenção dos enantiômeros provavelmente devido a interações não específicas com o polissacarídeo não reagido e/ou a superfície da sílica não recoberta durante o processo de recobrimento.

5. REFERÊNCIAS

- BAIRD, C. P.; TAYLOR, P. C. Asymmetric synthesis of epoxides using chiral sulfimides. *J. Chem. Soc.*, p. 893-894, 1995.
- BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. *Quím. Nova*, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.
- CABUSAS, M. H. Y. *Chiral separations on HPLC derivatized polysaccharide CSPs: temperature, mobile phase and chiral recognition mechanism studies*. 1998. Thesis (PhD)-Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1998.
- CASS, Q. B.; BASSI, A. L.; MATLIN, S. A. First direct resolution of gossypol enantiomers on a chiral high-performance liquid chromatography phase. *Chirality*, 11, p. 46-49, 1999.
- CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E.; BASSI, A. L.; CALAFATTI, S. A.; DEGANI, A. L. G. Discriminação quiral por CLAE em carbamatos de polissacarídeos: desenvolvimento, aplicações e perspectivas. *Quím. Nova*, v. 20, n. 1, p. 49-57, 1997.
- COIMBRA, M. *Determinação do coeficiente cromatográfico de partição, $\log k_w$, dos inibidores da bomba H^+/K^+ -ATPase*. 2007. 146 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)-Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- COLLINS, C. H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. cap. I, p. 17-45.
- DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento e aplicação de cromatografia líquida de alta eficiência multimodal e multidimensional com colunas de polissacarídeos em estudos de barreiras de racemização e determinação dos enantiômeros do pantoprazol em plasma*. 2001. 108 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica)-Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.
- FRANCOTTE, E. Contribution of preparative chromatography resolution to the investigation of chiral phenomena. *J. Chromatogr., A*, 666, p. 565-601, 1994.
- FRANCOTTE, E. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. *J. Chromatogr., A*, 906, p. 379-397, 2001.
- FRANCOTTE, E.; BUCHHEIT, A. J. Preparative chromatography separation of enantiomers. *J. Chromatogr., A*, 576, p. 1-45, 1992.



FREITAS, A. F. *Caracterização e aplicação da fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose na separação preparativa dos enantiômeros do omeprazol*. 2009. 118 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: *Fundamentos de Cromatografia*. Editora da UNICAMP: Campinas, 2006. cap. IX, p. 273-398.

MATLIN, S. A.; TIRITAN, M. E.; CRAWFORD, A. J.; CASS, Q. B.; BOYD, D. R. High with carbohydrate carbamate chiral phases: Influence of chiral phase structure on enantioselectivity. *Chirality*, v. 6, n. 2, p. 135-140, 1994.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. *J. Chromatogr., A*, 666, p. 403-419, 1994.

PINHEIRO, S.; FERREIRA, V. F. Abordagens em síntese assimétrica. *Quím. Nova*, v. 21, n. 3, p. 312-318, 1998.

PIRKLE, W. H.; POCHAPSKY, T. C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers. *Chem. Rev.*, v. 89, n. 2, p. 347-362, 1989.

VERSTEEG, M.; BEZUIDENHOUDT, B. C. B.; FERREIRA, D.; SWART, K. J. The first enantioselective synthesis of isoflavonoids: (R)- and (S)-Isoflavans. *J. Chem. Soc.*, p. 1317-1318, 1995.

YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *J. Chromatogr., A*, 906, p. 105-125, 2001.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, v. 68, p. 3289-3307, 1995.